

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520081153469

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

多药耐药肝癌细胞通过激活  $\text{TGF-}\beta\ 1/\text{Smad3}$   
信号富集  $\text{CD133}^+$  亚群细胞

Enrichment of  $\text{CD133}^+$  subpopulation in multidrug-resistant  
hepatocellular carcinoma cells through activation of  
 $\text{TGF-}\beta 1/\text{Smad3}$  activity

作 者 姓 名: 严威

指导教师姓名: 吴国洋 副教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2011 年 5 月 日

论文答辩时间: 2011 年 5 月 日

学位授予日期: 2011 年 7 月 日

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 5 月

多药耐药肝癌细胞通过激活 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号富集 CD133<sup>+</sup> 亚群细胞

严威

指导教师

吴国洋 副教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目 录

缩写词.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要... ..	3
材料... ..	5
方法... ..	6
结果 .....	8
讨论... ..	16
结论... ..	24
参考文献... ..	25
综述 1... ..	30
综述 2... ..	37
致谢... ..	62

## Table of Contents

<b>Abbreviation.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract in Chinese .....</b>	<b>2</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>3</b>
<b>Materials .....</b>	<b>5</b>
<b>Methods.....</b>	<b>6</b>
<b>Results.....</b>	<b>8</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>16</b>
<b>Conclusions.....</b>	<b>24</b>
<b>Reference.....</b>	<b>25</b>
<b>Review 1.....</b>	<b>30</b>
<b>Review 2... ..</b>	<b>37</b>
<b>Acknowledgement... ..</b>	<b>62</b>

## 缩 写 词

CSCs	Cancer Stem Cells
MDR	Multi-Drug Resistance
HCC	Hepatocellular Carcinoma
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor beta1
Smad	Drosophila mothers against decapentaplegic protein
SIS3	Specific Inhibitor of Smad3
DMEM/H	Dulbecco's modified Eagle's medium/high glucose
FBS	Fetal bovine serum
PBS	Phosphate buffered saline
PTX	Paclitaxel
DDP	Cisplatin
GEM	Gemcitabine
5-Fu	5-fluorouracil
ADM	Doxorubicin
MMC	Mitomycin
RI	Resistance Index
IC <sub>50</sub>	50% inhibiting concentration
CCK-8	Cell Counting Kit-8
FCM	Flow cytometry
WB	Western Blotting

## 摘要

**背景及目的** 肿瘤干细胞是肿瘤化疗失败的根源。在乳腺癌、肺癌及结直肠癌中,研究表明化疗可以富集肿瘤干细胞。然而化疗富集肿瘤干细胞的机制并不明确。CD133 分子作为分离肿瘤干细胞的常用标记,已在大量实体瘤中被证明。CD133<sup>+</sup>肝癌细胞已被证实具有肝癌干细胞的生物学特性。化疗能否富集肝癌干细胞,目前研究报道较少。我们主要探讨化疗能否富集肝癌干细胞(CD133<sup>+</sup>肝癌亚群细胞)并初步分析其调节肝癌干细胞的分子机制。

**方法** 采用紫杉醇(Paclitaxel, PTX)药物大剂量冲击间歇诱导法建立稳定的多药耐药细胞(Huh7.5.1/PTX)。CCK-8 试验检测耐药细胞及其亲本细胞的药物敏感性。Western Blot (WB)和流式细胞术(FCM)检测亲本细胞、耐药细胞及 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 1 中和抗体、Smad3 特异性抑制剂(SIS3)作用后的 Smad3 活性及 CD133 的表达变化。

**结果** 历时 6 个月建成 Huh7.5.1/PTX 细胞株,其对 PTX 高度耐药,耐药指数为 15.70,且对顺铂、5-氟尿嘧啶、阿霉素、丝裂霉素及吉西他滨等化疗药物有不同程度的交叉耐药性。FCM 结果显示 Huh7.5.1/PTX 细胞相比亲本细胞具有更高的 CD133<sup>+</sup>细胞比列(69.9% vs 19.4%,  $p < 0.01$ );TGF- $\beta$ 1 作用 Huh7.5.1 后 CD133<sup>+</sup>细胞比例增加(35.3% vs 18.6%,  $p < 0.01$ ),加入 SIS3 作用后 CD133<sup>+</sup>细胞比例减少(15.5% vs 35.3%,  $p < 0.01$ );SIS3 作用 Huh7.5.1 和 Huh7.5.1/PTX 细胞后 CD133<sup>+</sup>细胞出现明显的减少(11.9% vs 18.6%,  $p < 0.05$ ; 29.9% vs 69.3%,  $p < 0.01$ );TGF- $\beta$ 1 中和抗体作用 Huh7.5.1/PTX 细胞后 CD133<sup>+</sup>细胞比例减少(39.5% vs 53.6%,  $p < 0.01$ )。WB 结果证实了 FCM 的结果,显示 Huh7.5.1/PTX 细胞相比原代细胞高表达 CD133、TGF- $\beta$ 1 及磷酸化的 Smad3 表达增加;TGF- $\beta$ 1 作用 Huh7.5.1 后 CD133 表达增加,SIS3 作用后 CD133 表达降低;SIS3 作用 Huh7.5.1 和 Huh7.5.1/PTX 细胞后 CD133 表达降低;TGF- $\beta$ 1 中和抗体作用 Huh7.5.1/PTX 细胞后 CD133 表达降低。

**结论** Huh7.5.1/PTX 细胞具有多药耐药性。多药耐药的 Huh7.5.1/PTX 细胞富集了肝癌干细胞(CD133<sup>+</sup>肝癌细胞),其机制可能是通过激活 TGF- $\beta$ 1/Smad3 的活性。

**关键词:** 多药耐药; CD133; TGF- $\beta$ 1; Smad3; SIS3



## Abstract

**Background&Aims** Cancer stem cells (CSCs) are a small subset of cancer cells, which may be inherently resistant to the cytotoxic effect of chemotherapy. Some studies suggest that CSCs could be enriched by chemotherapy in breast, lung and colorectal cancer. However, the mechanism of chemotherapy regulating CSCs remains unknown. Therefore, our aim is to investigate whether chemotherapy could enrich liver cancer stem cells (LCSCs, CD133<sup>+</sup> subpopulation) and the molecular mechanism of chemotherapy regulating the expression of CSCs markers.

**Methods** In the present study, a multidrug-resistant (MDR) human HCC subline, Huh7.5.1/PTX, was developed by exposing parental cells to paclitaxel (PTX) repeatedly at a single high concentration. The CCK-8 assay was used to determine cellular sensitivity of various anticancer drugs. Flow cytometry (FCM) was used to analyze the CSCs markers expression level. Western blotting (WB) were used to analyze the changes of CD133, Smad3 and pSmad3 in different conditions (with or without TGF- $\beta$ 1, SIS3 and monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1 neutralization antibody stimulation).

**Results** PTX treatment of HCC cells in vitro resulted in a development of subline 6 months later, Huh7.5.1/PTX, with stable MDR phenotype (besides PTX, Huh7.5.1/PTX cells were also more resistant to some other anticancer drugs including DDP, 5-Fu, ADM, MMC and GEM). Huh7.5.1/PTX cells enriched cancer stem-like cell fraction (CD133<sup>+</sup> subpopulation) (69.9% vs 19.4%,  $p < 0.01$ ) and strongly activated the TGF- $\beta$ 1/Smad3 activity. In cultured Huh7.5.1 cells, CD133 expression was reduced with SIS3 (3  $\mu$ g/ml) alone stimulation (11.9% vs 18.6%,  $p < 0.05$ ). CD133 expression was reduced with SIS3 (3  $\mu$ g/ml) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) co-stimulation (15.5%) compared with the TGF- $\beta$ 1 alone stimulation (35.3%) ( $p < 0.01$ ). We also found that high concentration of TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) could up-regulate the percentage of CD133<sup>+</sup> cells in Huh7.5.1 cells (35.3% vs 18.6%) ( $p < 0.01$ ). In Huh7.5.1/PTX cells, FCM analysis showed decreased CD133 expression with SIS3 (3  $\mu$ g/ml) stimulation (29.9%) compared with CD133 expression of control group

cells(69.9%)( $p<0.01$ ), and reduce expression of CD133 with monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1 neutralization antibody(10 ug/ml) stimulation (39.5%) compared to the control group (53.6%) ( $p<0.01$ ), respectively. WB results demonstrated FCM results.

**Conclusion** Huh7.5.1/PTX cells have multidrug resistance(MDR).MDR HCC cells are enriched with cancer stem-like cells(CD133<sup>+</sup> subpopulation) ,which is partially dependent on TGF-beta1/Smad3 activity.

**Key words:** multidrug resistance(MDR); CD133; TGF- $\beta$ 1; Smad3; SIS3

## 材 料(主要材料)

人肝癌 Huh7. 5. 1 细胞 (哈佛大学麻省总院林温育赠送);  
胎牛血清 (Hyclone)、胰蛋白酶、DMEM 培养基、青霉素、链霉素 (Gibco);  
CCK-8 检测试剂盒 (Beyotime);  
紫杉醇 (贵州汉方制药有限公司)、  
顺铂 (南京制药厂有限公司)、  
5-氟尿嘧啶 (上海旭东海普药业有限公司)、  
阿霉素 (浙江海正药业股份有限公司)、  
丝裂霉素 (浙江海正药业股份有限公司)、  
吉西他滨 (江苏豪森药业股份有限公司);  
流式细胞术抗体  
PE anti-human CD133 (eBioscience) 及其同型抗体 (eBioscience);  
WB 一抗: 兔抗人 CD133 (abcam)、兔抗人 Smad3 (abcam)、兔抗人磷酸化 Smad3  
(pSmad3) (abcam) 及二抗 (abcam)。  
荧光标记的抗人 CD29, CD34, CD44, CD54, CD105 (ICAM-1) 及其相关同型抗体  
(eBioscience)  
CD90, CD326 (EpCAM), and CD338 (ABCG2) 及其相关同型抗体 (Biolegend)  
细胞因子 TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  1 中和抗体和  $\beta$ -actin 抗体 (R&D Systems )  
Smad3 特异性抑制剂 SIS3 (Merck)

## 方 法

### 1. Huh7. 5. 1/PTX 细胞的建立

Huh7. 5. 1 细胞在 DMEM 高糖培养基, 含 10%胎牛血清、青霉素 (100 u/ml)、链霉素 (100 ug/ml), 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 条件下培养, 0. 25%胰蛋白酶消化传代。采用 PTX 大剂量冲击间歇诱导法建株, 以含终浓度为 5 ug/ml 的 PTX 培养液冲击处于对数生长期的 Huh7. 5. 1 细胞, 作用 12h 后弃含药培养液, PBS 洗 3 遍, 加入新鲜培养液继续培养, 2~3 d 换液洗去漂浮死亡的细胞, 待其恢复对数生长后再次使用 5 ug/ml 的 PTX 进行冲击, 如此反复作用 6 次。历时 6 个月得到 Huh7. 5. 1/PTX 耐药细胞系, 并将其维持培养在含 0. 01 ug/ml 的 PTX 完全培养液中, 实验前 3 周更换为不含 PTX 的完全培养液并至少传代 3 次供后续试验使用。

### 2. CCK-8 试验检测 Huh7. 5. 1 及 Huh7. 5. 1/PTX 细胞的敏感性

对数生长期的亲本细胞及耐药细胞常规消化, 用含体积分数为 5%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释至  $5 \times 10^4$  /ml 细胞, 接种 96 孔细胞培养板, 每孔 100  $\mu$ L; 培养 24 h, 使细胞贴壁良好。加入不同浓度梯度的紫杉醇、顺铂、5-氟尿嘧啶、阿霉素、丝裂霉素及吉西他滨, 每种药物 8 个等比稀释剂量组, 5 孔/ 组, 继续培养 48 h 后, 加入 CCK-8 溶液避光孵育 30min, 酶标仪在波长 490 nm 处测定吸光度 (OD) 值。SPSS 13. 0 软件求算各种药物对细胞 50%抑制率剂量 (IC<sub>50</sub>), 计算耐药指数: RI (Resistance Index) = IC<sub>50</sub> (Huh7. 5. 1/PTX) / IC<sub>50</sub> (Huh7. 5. 1)。

### 3. 流式细胞术检测 CD133 的变化

收集实验组和对照组细胞, PBS 洗 1 次, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  /ml。取流式细胞仪专用试管, 每管加细胞悬液 100  $\mu$ l, 加 PE 标记的抗人 CD133 抗体, 同时设置同型对照, 避光孵育 30 min, PBS 洗 1 次, 以 400 $\mu$ lPBS (含 2%胎牛血清) 重悬, 待机上检。

### 4. WB 检测 CD133、Smad3、pSmad3 的表达

收取对数期生长细胞,提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取总蛋白 20ug,10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,滤膜经脱脂奶粉封闭后,常规分别结合兔抗人 CD133 抗体(1:1000)、兔抗人 Smad3 抗体(1:1000)、兔抗人 pSmad3 抗体(1:1000)、兔抗人 Smad4 抗体(1:1000)、鼠抗人 TGF- $\beta$  1 抗体(1:500),4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10min,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔及抗鼠二抗(1:5000),37℃ 孵育 1h, TBST 洗膜 3 次,暗室内 ECL 显色,X 光片曝光成像。 $\beta$ -actin 作为内参照。

## 5. TGF- $\beta$ 1、Smad3 抑制剂 SIS3 和 TGF- $\beta$ 1 中和抗体干扰试验

为了检测 TGF- $\beta$  1、SIS3 和 TGF- $\beta$  1 中和抗体对 CD133 表达的影响,常规培养耐药细胞及其亲本细胞,待处于对数生长期后,弃完全培养基,换无血清的 DMEM 培养基作用 12h 后,改换不含血清的含 TGF- $\beta$  1 (终浓度 10 ng/ml)、SIS3 药物(终浓度 3 ug/ml) 和 TGF- $\beta$  1 中和抗体(终浓度 10ug/ml)的培养基作用细胞,同时设立相对应的对照组。作用 48h 后,消化细胞进行 FCM 检测 CD133 的表达变化,收集细胞提取蛋白行 WB 检测 TGF- $\beta$  1、Smad3、pSmad3 及 CD133 的变化。

## 6. 统计学方法

数据以均值 $\pm$ 标准差表示,各组实验独立重复至少 3 次,各数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,差异采用单因素方差分析(one-way analysis of variance)或 t 检验(Student t test)进行统计。 $p < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 结 果

### 1. Huh7. 5. 1/PTX 细胞具有多药耐药性

采用紫杉醇 PTX 大剂量冲击间歇诱导法, 历时 6 月建立的细胞株 Huh7. 5. 1/PTX, 对 PTX 高度耐药, 对 PTX 的耐药指数高达 15.70 (图 1) ( $p<0.01$ )。进一步分析其他的不同化疗药物对 Huh7. 5. 1 细胞及 Huh7. 5. 1/PTX 细胞的作用, 结果发现耐药细胞 Huh7. 5. 1/PTX 对这些药物均有不同程度的耐药 (图 1, 图 2) ( $p<0.01$ )。

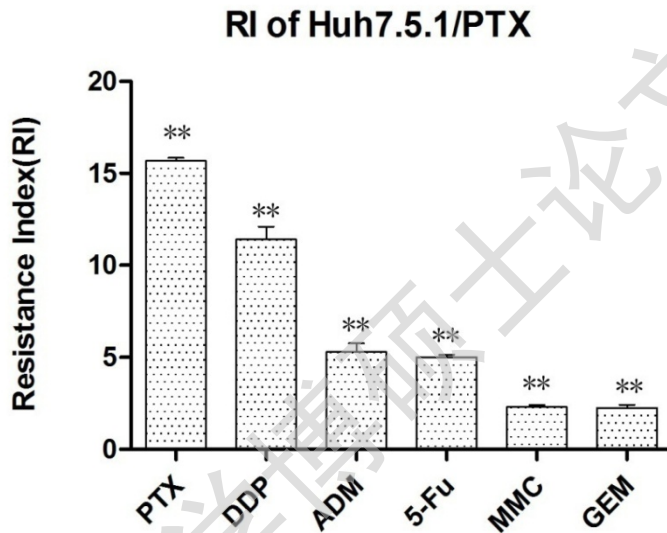


图 1 Huh7. 5. 1/PTX 细胞的耐药指数 (RI)。PTX: 紫杉醇; DDP: 顺铂; ADM: 阿霉素; 5-Fu: 5-氟尿嘧啶; MMC: 丝裂霉素; GEM: 吉西他滨。 \*\* $p<0.01$ . RI(Resistance Index) of Huh7.5.1/PTX cells to anti-cancer drugs. Huh7.5.1/PTX cells showed highest resistance to PTX and have multi-drug resistance. RI of Huh7.5.1/PTX cells to PTX, DDP, 5-Fu, ADM, GEM, and MMC was 15.70, 11.41, 5.00, 5.29, 2.26 and 2.31, respectively. \*\* $p<0.01$  (one-way analysis of variance) Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation for at least three independent experiments.

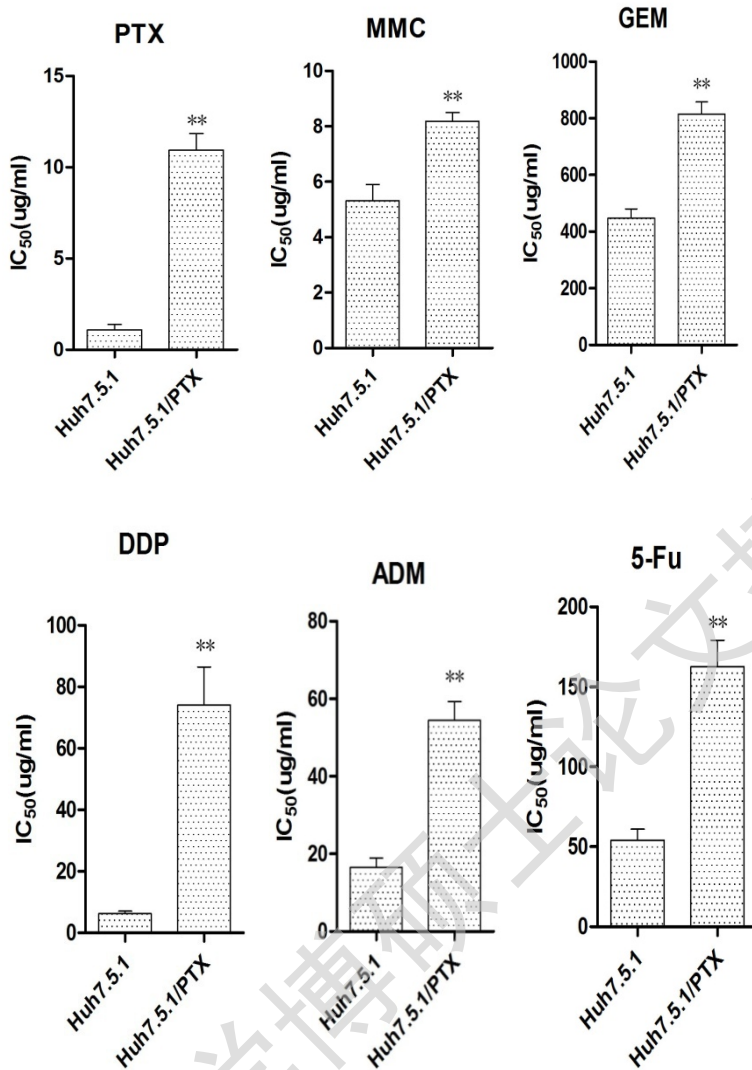


图 2 Huh7.5.1/PTX 细胞对不同化疗药物的敏感性比较。Huh7.5.1/PTX cells show more resistance to PTX, DDP, GEM, 5-Fu, ADM and MMC than parental Huh7.5.1 cells. \*\* $p < 0.01$  (Student t test) PTX: 紫杉醇; DDP: 顺铂; ADM: 阿霉素; 5-Fu: 5-氟尿嘧啶; MMC: 丝裂霉素; GEM: 吉西他滨.

## 2. Huh7.5.1/PTX 细胞具有较高比例的 CD133 阳性细胞

FCM 结果显示亲本 Huh7.5.1 细胞中 CD133<sup>+</sup> 细胞亚群比例占 19.4%，而耐药细胞 Huh7.5.1/PTX 中 CD133 的比例则升高到了 69.9% (图 3) ( $p < 0.01$ )。

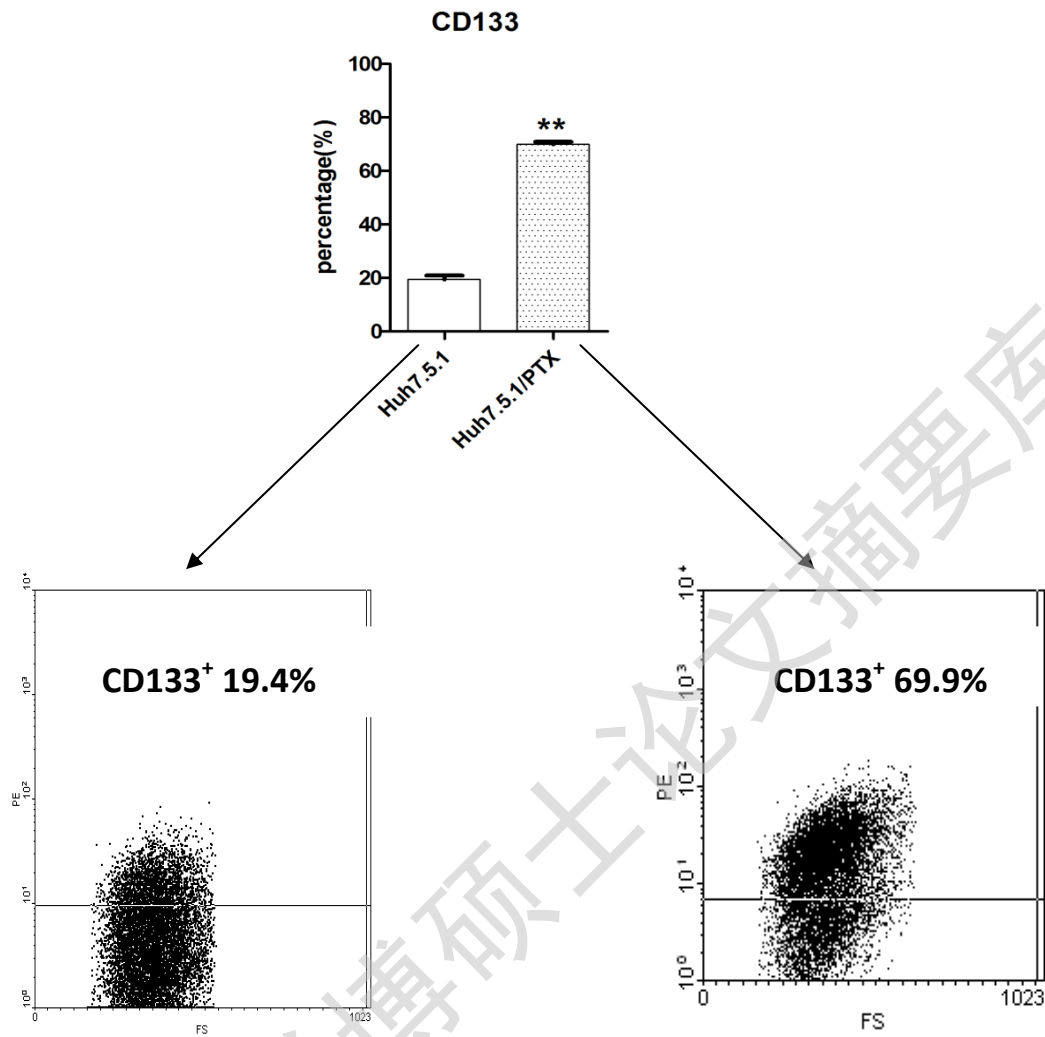


图 3 FCM 检测 Huh7.5.1 及 Huh7.5.1/PTX 细胞 CD133 的表达. The proportion of CD133 in Huh7.5.1 and Huh7.5.1/PTX cells was examined by flow cytometry (FCM). \*\* $p < 0.01$  (Student t test)

### 3. Huh7.5.1/PTX 细胞具有较高的 TGF- $\beta$ 1、Smad3 活性及 CD133 表达

WB 结果显示耐药细胞 Huh7.5.1/PTX 相比亲本细胞 Huh7.5.1，总的 Smad3 水平及 Smad4 没有变化，但磷酸化即活化的 Smad3 活性增强了，同时 TGF- $\beta$  1、CD133 的表达也增加了（图 4）。CD133 的 WB 结果也验证了上述流式细胞检测的结果。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库